



0021-7557/08/84-06

Jornal de Pediatria

Copyright © 2008 by Sociedade Brasileira de Pediatria

ARTIGO ORIGINAL

# Accuracy of white blood cell count, C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha for diagnosing late neonatal sepsis

*Acurácia diagnóstica do leucograma, proteína C-reativa, interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa na sepse neonatal tardia*

Jamil P. S. Caldas<sup>1</sup>, Sérgio T. M. Marba<sup>2</sup>, Maria H. S. L. Blotta<sup>3</sup>, Roseli Calil<sup>4</sup>, Sirlei S. Moraes<sup>5</sup>, Rômulo T. D. Oliveira<sup>6</sup>

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o valor do leucograma, proteína C-reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), isoladamente e em conjunto, na detecção da sepse neonatal tardia.

**Métodos:** Estudo de validação diagnóstica. A PCR, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram dosados por quimioluminescência à suspeita clínica, 24 e 48 horas depois, e o leucograma unicamente à suspeita. De acordo com evolução clínica e resultados de culturas, três grupos foram definidos: sepse comprovada (SC), sepse provável (SP) e não infectados (NI). Os testes estatísticos utilizados foram os de Wilcoxon, qui-quadrado e análise de variância de Friedman e os limites de corte foram obtidos pela construção da curva ROC.

**Resultados:** Estudaram-se 82 crianças, sendo 42 no grupo SC, 16 no SP e 24 NI. Nos três momentos, as medianas da PCR e da IL-6 mostraram-se significativamente mais elevadas nos grupos SC e SP, e as do TNF- $\alpha$  alteraram-se apenas no grupo SC. Os índices diagnósticos da PCR foram elevados nos três momentos e com acurácia superior a do leucograma e semelhante a da IL-6 e a do TNF- $\alpha$  em suas primeiras medidas. Entre as citocinas, não houve diferença estatística entre elas, nem em relação ao leucograma. A associação dos testes não aumentou a capacidade diagnóstica, exceto na combinação entre leucograma e PCR2 e na dosagem seriada de PCR.

**Conclusões:** A PCR e o leucograma mostram-se úteis no diagnóstico de sepse neonatal tardia e comparáveis à IL-6 e ao TNF- $\alpha$ . A acurácia aumentou com a associação PCR-leucograma e a dosagem seriada da PCR.

*J Pediatr (Rio J). 2008;84(6):536-542: Recém-nascido, sepse, proteína C-reativa, interleucina-6, fator de necrose tumoral, citocina, mediadores da inflamação.*

## Abstract

**Objective:** To evaluate the diagnostic value for late neonatal sepsis of white blood cell count (WBC) and assays for C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), in isolation and in conjunction.

**Methods:** This was a diagnostic test validation study. Chemiluminescence was used to assay CRP, IL-6 and TNF- $\alpha$  at the time of clinical suspicion and again after 24 and 48 hours, whereas the WBC was performed only once, at the time of suspicion. Patients were classified into three groups based on clinical progress and culture results: confirmed sepsis (CS), probable sepsis (PS), and not infected (NI). Statistical analysis was performed using the Wilcoxon and chi-square tests and Friedman analysis of variance; cutoffs were defined by plotting receiver operator characteristic curves.

**Results:** The total study sample comprised 82 children, 42 of whom were classed as CS, 16 as PS and 24 as NI. At all three test times, the medians for CRP and IL-6 were significantly more elevated in the CS and PS groups, while the medians for TNF- $\alpha$  were abnormal only in the CS group. The CRP test had elevated indices of diagnostic utility at all three test times, better accuracy than the WBC and similar accuracy to the first IL-6 and TNF- $\alpha$  assays. There was no statistical difference between the cytokines, nor between them and the WBC. Combining tests did not increase diagnostic power, with the exception of the combination of WBC with CRP2 and when the sequential CRP assays were combined.

**Conclusions:** Both CRP and WBC were useful for the diagnosis of late neonatal sepsis and comparable with IL-6 and TNF- $\alpha$ . Accuracy increased when CRP and WBC were combined and when sequential CRP assay results were used.

*J Pediatr (Rio J). 2008;84(6):536-542: Neonate, sepsis, C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor, cytokine, inflammatory mediators.*

1. Mestre, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP. Médico assistente, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, UNICAMP, Campinas, SP.
2. Professor livre-docente, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP.
3. Doutora. Professora assistente, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP.
4. Doutora, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP. Médica assistente, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, UNICAMP, Campinas, SP.
5. Estatística, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, UNICAMP, Campinas, SP.
6. Biólogo. Mestre, Ciências Médicas, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP.

Artigo elaborado a partir da dissertação de mestrado defendida em 21 de fevereiro de 2006 na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas (SP), intitulada "A utilidade do leucograma, proteína C-reativa, interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa no diagnóstico da sepse neonatal tardia", por Jamil P. S. Caldas.

Apoio financeiro: Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 01/028361.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

**Como citar este artigo:** Caldas JP, Marba ST, Blotta MH, Calil R, Moraes SS, Oliveira RT. Accuracy of white blood cell count, C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha for diagnosing late neonatal sepsis. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(6):536-542.

Artigo submetido em 16.05.08, aceito em 11.08.08.

doi:10.2223/JPED.1838

## Introdução

A sepse continua a ser uma das doenças mais frequentes no período neonatal, permanecendo como uma importante causa de mortalidade e morbidade<sup>1,2</sup>. Os fatores relacionados ao seu aparecimento no recém-nascido (RN), especialmente no pré-termo, são a necessidade de utilização de procedimentos invasivos, associados à imaturidade imunológica<sup>3-5</sup>.

A sepse neonatal apresenta em geral um início insidioso, com sinais e sintomas na maioria das vezes bastante inespecíficos, confundidos com condições próprias da idade e com a evolução por vezes instável do RN de muito baixo peso<sup>5-8</sup>.

A hemocultura é considerada o padrão-ouro no diagnóstico da sepse neonatal. No entanto, sua positividade varia amplamente (50 a 87%) e os resultados não estão disponíveis rapidamente para definição da conduta terapêutica. Dessa forma, lança-se mão de outros exames laboratoriais de rápida execução. Dentre eles estão o leucograma e os marcadores séricos de reação inflamatória, como a interleucina-8, a proteína C-reativa (PCR), a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e a procalcitonina<sup>5,8-10</sup>.

Esses marcadores biológicos, aliados à avaliação clínica, aumentam a probabilidade de acerto diagnóstico e trazem mais segurança ao médico em iniciar precocemente o uso de antimicrobianos, ao lado de tratamento de suporte. Por outro lado, pode evitar o uso indiscriminado de tratamento com antibióticos e, assim, diminuir o risco de desenvolvimento de patógenos multirresistentes e proporcionar a diminuição dos custos hospitalares.<sup>4,8,11,12</sup>

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi verificar o valor do leucograma, da PCR, IL-6 e do TNF- $\alpha$ , isoladamente e em conjunto, na detecção da sepse neonatal tardia em diferentes períodos nas primeiras 48 horas da doença.

## Métodos

Foi realizado um estudo de validação diagnóstica. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, e para a coleta dos exames obteve-se a autorização dos pais por termo de consentimento livre e esclarecido.

Os sujeitos do estudo foram todos os RN com suspeita clínica de sepse tardia, definida como aquela cujo aparecimento dos sintomas iniciou-se após 48 horas de vida<sup>13</sup>, internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal no período de setembro de 2001 a maio de 2003. Foram excluídas as crianças com infecção crônica congênita comprovada, uso prévio de imunoglobulina, não-obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido dos pais e aquelas em que não foi possível a coleta seriada dos marcadores (pelo menos duas das três amostras).

Foram considerados como indicativos clínicos de sepse os seguintes sinais e sintomas, em combinações variáveis: distúrbio da temperatura, apnéia, bradicardia, taquicardia, hipotensão, palidez, alteração da perfusão periférica, gemência, taquipnéia,

piora respiratória, cianose, vômitos, resíduos gástricos, distensão abdominal, enterorragia, sangramentos em geral ou alteração aguda do tônus ou comportamento (hipo ou hipertonia, irritabilidade, letargia, convulsão).

Dos RN com suspeita clínica de sepse tardia, de acordo com a rotina do serviço, foram colhidas amostras de sangue para hemograma, PCR e hemocultura e coletas de liquor e urina. Após coleta de culturas, a antibioticoterapia foi iniciada em todos eles. Radiografias de tórax e/ou abdômen foram realizadas conforme necessidade clínica.

O leucograma foi considerado alterado se a relação neutrófilos imaturos/totais e a contagem total de neutrófilos estivessem simultaneamente alteradas<sup>14</sup>. A dosagem de PCR utilizada normalmente na assistência ao RN foi dosada por nefelometria (limite de corte de 1 mg/dL) e não foi considerada na análise. Para o estudo, a PCR foi dosada posteriormente, em conjunto com a IL-6 e o TNF- $\alpha$ .

As amostras de sangue para hemocultura foram obtidas sequencialmente em locais distintos, de sangue periférico, por técnica asséptica, e a leitura de hemocultura se fez por método automatizado (BacT/ALERT® PF, BioMérieux Inc., Durham, NC, EUA). A coleta de liquor foi por punção lombar, e as amostras de urina foram obtidas por punção suprapúbica. Nos casos de instabilidade clínica importante, que dificultou a coleta de liquor, e/ou presença de oligoanúria, que dificultou a obtenção da amostra de urina, tais coletas não foram realizadas.

A hemocultura foi considerada positiva quando houve crescimento do mesmo microrganismo nas duas amostras em até 72 horas após a coleta, com o mesmo padrão de sensibilidade antimicrobiana.

As amostras seriadas de sangue para dosagem de PCR, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram colhidas no momento da suspeita clínica, 24 e 48 horas após. O leucograma foi avaliado à suspeita do quadro. A coleta se fez preferencialmente durante a coleta de exames de rotina da UTI, por venopunção, sendo a primeira amostra obtida antes da administração dos antimicrobianos. A amostra de 1 mL de sangue foi acondicionada em tubo plástico e encaminhada rapidamente ao laboratório, onde foi processada e o plasma congelado a -70 °C.

As amostras foram dosadas posteriormente, em momento único, por operador cego para a história clínica dos RN. Mensuração através de analisador automático (IMMULITE® PILK6P-4, Euro/DPC Ltd, Reino Unido) por ensaio enzimaimunométrico-quimioluminescência, de acordo com as orientações do fabricante. A sensibilidade analítica do método para a PCR é de 0,01 mg/dL; para a IL-6, é de 5 pg/mL; e para o TNF- $\alpha$ , é de 1,7 pg/mL. A faixa de calibração é de 15 mg/dL para o PCR, até 1.000 pg/mL para a IL-6 e até 1.000 pg/mL para o TNF- $\alpha$ . Os valores menores e maiores que esses foram obtidos por extrapolação baseados nos testes de linearidade descritos pelo fabricante dos reagentes.

Após 72 horas do início do quadro, a equipe assistencial classificou os sujeitos em três grupos, de acordo com a evolução clínica, os resultados de cultura, leucograma e a PCR da rotina. Portanto, a equipe desconhecia os resultados dos marcadores estudados na pesquisa. Os pacientes foram classificados da seguinte forma:

- A - Sepsis comprovada por cultura (SC): quadro clínico compatível com sepsis e cultura positiva, podendo esta ser de sangue, urina ou liquor;
- B - Sepsis provável (SP): quadro clínico compatível com sepsis, leucograma e/ou PCR alterados e/ou radiografia de tórax compatível com pneumonia, porém com culturas negativas;
- C - Não infectados (NI): quadro clínico inicial suspeito de sepsis, porém com evolução clínica não compatível, leucograma e PCR normais e culturas negativas.

O uso de antimicrobianos foi mantido nos grupos A e B e suspenso no grupo C após 72 horas de uso.

A determinação do tamanho amostral baseou-se na sensibilidade de cada teste diagnóstico, com uma precisão satisfatória, e no trabalho de Silveira & Procianny<sup>15</sup>, no qual foram encontradas sensibilidades de 90 e 87,9%, para a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , respectivamente. Foram assumidos um nível de significância de 5%, uma taxa de 60% de positividade de hemocultura e uma precisão de 10 e 11%, respectivamente, para cada sensibilidade, podendo, então, a sensibilidade de IL-6 variar entre 90 $\pm$ 10% e a de TNF- $\alpha$  entre 87,9 $\pm$ 11%. Com base nessas estimativas, o tamanho da amostra foi estimado em n = 69 pacientes.

O teste do qui-quadrado, ou Fisher quando necessário, foi utilizado para comparação dos grupos quanto ao peso de nascimento, sexo, estado nutricional ao nascimento, idade gestacional, idade à época da suspeita do quadro e valores de Apgar de 1º e 5º minutos.

Para comparação dos valores de PCR, IL-6 e TNF- $\alpha$  entre os grupos e entre os tempos de medida, as medianas foram comparadas utilizando-se a análise de variância de Friedman e teste de Wilcoxon. Para determinar os níveis de corte das duas citocinas e do PCR, construiu-se uma curva ROC (*receiver operator characteristic*), e os dados foram obtidos a partir da análise dos valores encontrados nos grupos com sepsis comprovada e de RN NI. Para o cálculo dos índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia, utilizaram-se os limites de corte obtidos pela curva ROC e obtidos os intervalos de confiança de 95%. O nível de significância aceito foi de  $p < 0,05$ . Os cálculos estatísticos foram realizados através do pacote estatístico SPSS 7.5 for Windows.

## Resultados

De um total de 96 RN com quadro suspeito de sepsis tardia, foram retirados 14 sujeitos pelos critérios de exclusão.

Assim, foram estudadas 82 crianças, sendo 42 RN com episódios de sepsis comprovada por cultura, 16 com sepsis provável e 24 crianças NI.

Os três grupos de RN foram comparáveis quanto ao peso ao nascer, sexo, idade gestacional, idade à época de aparecimento dos sintomas e índices de Apgar. As medianas de peso ao nascer do grupo SC foi de 1603 $\pm$  827,82 g; do grupo SP, de 1760,94 $\pm$ 878,86 g; e no grupo NI, de 1970,21 $\pm$ 1009,21 g. O sexo masculino foi mais freqüente nos três grupos (47,6% no grupo SC, 81,3% no grupo SP e 54,2% no grupo NI). As medianas de idade gestacional foram de 31 semanas no grupo SP, 33 semanas no grupo SP e 32 semanas no grupo NI. A idade à suspeição clínica de sepsis foi de 14 dias no grupo SP, 12 no grupo SP e 10 no grupo NI, e a freqüência de crianças com Apgar de 5º minuto  $\geq 7$  foi de 88, 100 e 96%, respectivamente para os grupos SP, SC e NI.

No grupo de sepsis comprovada houve predomínio de infecção primária da corrente sanguínea (67% dos casos), com predomínio de *S. epidermidis* (16 casos) e *S. aureus* (12 casos). Em 18 casos (43%) houve localização, sendo oito casos com pneumonia, três com meningite, cinco com infecção do trato urinário e dois com enterocolite necrosante. Nesse mesmo grupo, a cultura de sangue foi positiva em 38 casos (90%), e em apenas quatro casos o agente foi isolado somente na urina. Nos três casos de meningite a cultura de sangue também foi positiva, e em um caso de candidíase sistêmica foram positivas as culturas de sangue e urina.

No grupo SC, o leucograma foi considerado alterado em 27 casos (64,3%) e normal em 15 (35,7%). No grupo SP, o padrão foi semelhante, estando alterado em 11/16 dos sujeitos (68,8%). No grupo NI, ele estava anormal em apenas seis casos (25%).

Para os marcadores séricos, os limites de corte para PCR, obtidos a partir do ponto de maximização pela curva ROC, foram: 1ª medida (PCR1), 1,73 mg/dL; 2ª medida (PCR2), 1,16mg/dL; 3ª medida (PCR3), 1,32 mg/dL. Para a IL-6: 1ª medida (IL-6 1), 25,8 pg/mL; 2ª medida (IL-6 2), 14 pg/mL; 3ª medida (IL-6 3), 5,6 pg/mL. Para o TNF- $\alpha$ : 1ª (TNF1) e 3ª medidas (TNF3), 12,5 pg/mL; 2ª medida (TNF2), 11pg/mL. As áreas sob a curva para esses exames foram, respectivamente: PCR1, 0,92; PCR2, 0,94; PCR3, 0,93; IL-6 1, 0,85; IL-6 2, 0,72; IL-3, 0,66; TNF1, 0,84; TNF2, 0,80; TNF3, 0,73.

A mediana da PCR mostrou-se elevada nos três tempos de aferição nos dois grupos sépticos, com diferença estatisticamente significativa em todos os momentos em relação ao grupo de NI ( $p < 0,0001$ ). Verificou-se uma ascensão significativa do valor da mediana da PCR1 para a PCR2 no grupo SC ( $p = 0,0019$ ) e SP ( $p = 0,0155$ ). Nos RN NI não houve diferença estatística entre as três medidas (Tabela 1).

Os valores de mediana da IL-6 no grupo SC foram estatisticamente superiores aos do grupo NI nos três momentos ( $p$

**Tabela 1** - Valores de mediana da PCR nos grupos de sepse comprovada, sepse provável e de recém-nascidos não infectados nos três momentos de coleta

Momento da coleta	Sepse comprovada (n = 42)	Sepse provável (n = 16)	Não infectado (n = 24)	p*
PCR 1ª medida	5,09 (0,56-30,60)	4,14 (0,19-31,30)	0,28 (0,01-3,61)	< 0,0001
PCR 2ª medida	9,90 (0,29-83,20)	9,93 (0,70-31,90)	0,51 (0,01-2,38)	< 0,0001
PCR 3ª medida	5,74 (0,11-144,00)	6,21 (0,46-60,90)	0,33 (0,02-3,20)	< 0,0001

PCR = proteína C-reativa.

Valores expressos em mg/dL – mediana (variação).

\* Diferença estatisticamente significativa entre medianas dos grupos de sepse comprovada ou provável e grupo não infectado.

**Tabela 2** - Valores de mediana da IL-6 nos grupos de sepse comprovada, sepse provável e de recém-nascidos não infectados nos três momentos de coleta

Momento da coleta	Sepse comprovada (n = 42)*	Sepse provável (n = 16) <sup>†</sup>	Não infectado (n = 24)
IL-6 1ª medida	63,15 (3,00-29.079,00)	133,50 (0,99-8.746,00)	5,00 (2,10-69,50)
IL-6 2ª medida	27,00 (1,60-23.818,00)	14,70 (1,40-1.047,00)	5,00 (1,30-52,30)
IL-6 3ª medida	9,05 (0,00-19.998,00)	6,30 (2,40-139,00)	5,00 (1,00-40,10)

IL-6 = interleucina-6.

Valores expressos em pg/mL – mediana (variação).

\* Diferença estatisticamente significativa entre medianas dos grupos SC e NI nos três momentos (p &lt; 0,0001; p = 0,0024 e p = 0,0317, respectivamente).

<sup>†</sup> Diferença estatisticamente significativa entre medianas dos grupos SP e NI nos três momentos (p < 0,0016; p = 0,0219 e p = 0,0373, respectivamente).

< 0,0001, p = 0,0024 e p = 0,0317, respectivamente). Ocorreu uma queda progressiva e significativa da primeira para segunda mediana (p = 0,0036) e desta para a terceira (p = 0,00174). No grupo SP, as medianas também foram estatisticamente significativas em todos os momentos (p = 0,0016, p = 0,0219 e p = 0,0373), e com queda importante da primeira para a segunda medida (p = 0,0052). No grupo NI, as medianas permaneceram constantes (Tabela 2).

O grupo SC apresentou valores de mediana de TNF- $\alpha$  significativamente mais elevados que aqueles do grupo NI nos três momentos (p < 0,0001; p = 0,0002 e p = 0,0038, respectivamente), com queda nos valores de mediana do TNF1

para TNF2 (p = 0,0145) e deste para TNF3 (p = 0,0320). No grupo SP, não ocorreu diferença significativa (p = 0,1668, p = 0,5209 e p = 0,9019) e nem queda nos valores de mediana ao longo de tempo (p = 0,0830 e p = 0,1465). No grupo NI, a mediana se manteve quase inalterada nos três momentos de coleta (Tabela 3).

Em relação aos índices diagnósticos, a PCR mostrou valores elevados nos índices diagnósticos nas três aferições, sem diferença significativa ao longo do tempo para a sensibilidade (p = 0,1353), a especificidade (p = 1,0) e a acurácia (p = 0,1062), e com índices elevados de valor preditivo negativo nos três momentos. A acurácia do teste foi superior a do leucograma nos três momentos (p = 0,0335, p = 0,010 e p =

**Tabela 3** - Valores de mediana do TNF- $\alpha$  nos grupos de sepse comprovada, sepse provável e de recém-nascidos não infectados nos três momentos de coleta

Momento da coleta	Sepse comprovada (n = 42)*	Sepse provável (n = 16) <sup>†</sup>	Não infectado (n = 24)
TNF- $\alpha$ 1ª medida*	24,70 (4,80-397,00)	10,05 (0,02-47,70)	6,40 (2,10-29,70)
TNF- $\alpha$ 2ª medida <sup>†</sup>	19,20 (4,30-376,00)	8,10 (2,00-37,20)	6,60 (0,75-30,40)
TNF- $\alpha$ 3ª medida	15,00 (1,40-238,00)	6,7 (2,30-28,50)	7,00 (3,70-17,30)

TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral-alfa.

Valores expressos em pg/mL – mediana (variação).

\* Diferença estatisticamente significativa entre medianas dos grupos SC e NI nos três momentos (p &lt; 0,0001; p = 0,0002 e p = 0,0038, respectivamente).

<sup>†</sup> Sem diferença estatisticamente significativa entre medianas dos grupos SP e NI nos três momentos (p = 0,1668; p = 0,5209 e p = 0,9019, respectivamente).

**Tabela 4** - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e acurácia nos diferentes tempos para PCR, IL-6, TNF- $\alpha$  e leucograma

Exame	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)	VPP	VPN	Acurácia (IC95%)
PCR					
1ª medida	78,6 (66,2-100,0)	87,5 (74,3-100,0)	91,7	70,0	81,8 (72,5-91,1)
2ª medida	90,5 (81,6-99,4)	87,5 (74,3-100,0)	92,7	84,0	89,4 (82,0-96,8)
3ª medida	85,7 (75,1-96,3)	91,7 (80,6-100,0)	94,7	78,6	87,9 (80,0-95,8)
IL-6					
1ª medida	77,5 (64,9-90,4)	87,0 (73,2-100,0)	91,2	69,0	81,0 (71,3-90,6)
2ª medida	64,3 (49,8-78,8)	83,3 (68,4-98,2)	87,1	67,1	71,2 (60,3-82,1)
3ª medida	64,3 (49,8-78,8)	75,0 (57,7-92,3)	81,8	54,5	68,2 (56,9-79,4)
TNF- $\alpha$					
1ª medida	74,3 (59,8-86,8)	81,8 (65,7-97,9)	86,7	66,7	77,2 (66,3-88,1)
2ª medida	71,8 (57,7-85,9)	86,4 (72,0-100,0)	90,3	63,3	77,0 (66,5-87,6)
3ª medida	62,2 (46,5-77,8)	95,2 (86,1-100,0)	95,8	58,8	74,1 (62,9-85,4)
Leucograma	64,3 (49,8-78,8)	75,0 (58,7-92,3)	81,8	54,5	68,2 (56,9-79,4)
Associações					
Leuc + PCR1	87,5 (74,3-100,0)	90,9 (78,9-100,0)	91,3	87,0	89,1 (80,1-98,1)
Leuc + PCR2*	100,0 (100,0-100,0)	94,1 (82,9-100,0)	95,8	100,0	97,5 (92,7-100,0)
PCR1 + PCR2†	95,0 (88,2-100,0)	84,2 (67,8-100,0)	92,7	88,9	91,5 (84,4-98,6)
PCR1 + IL-6 1	88,0 (75,3-100,0)	90,0 (76,9-100,0)	91,7	85,7	88,9 (79,7-98,1)
PCR1 + TNF1	95,2 (86,1-100,0)	94,1 (82,0-100,0)	95,2	94,1	94,7 (87,6-100,0)
PCR2 + IL-6 1	93,5 (84,9-100,0)	90,5 (77,9-100,0)	93,5	90,5	92,3 (85,1-99,6)
PCR2 + TNF1	95,8 (87,8-100,0)	94,1 (82,9-100,0)	95,8	94,1	95,1 (86,5-100,0)
IL-6 1 + TNF1	87,0 (73,2-100,0)	94,1 (82,9-100,0)	95,2	90,0	90,0 (80,7-99,30)

IC95% = intervalo de confiança de 95%; IL-6 = interleucina-6; Leuc = Leucograma; PCR = proteína C-reativa; TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral-alfa; VPN = valor preditivo negativo; VPP = valor preditivo positivo. O número à frente do teste indica o momento da coleta.

\* Diferença estatisticamente significativa entre os valores de sensibilidade da associação e a do leucograma isoladamente ( $p = 0,018$ ).

† Diferença estatisticamente significativa entre os valores de sensibilidade da associação e a da PCR1 ( $p = 0,0321$ ).

0,0024). Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia do teste no primeiro momento foram semelhantes àqueles da IL-6 1 ( $p = 0,9070$ ,  $p = 0,9557$  e  $p = 0,5502$ , respectivamente) e TNF1 ( $p = 0,6594$ ,  $p = 0,5947$  e  $p = 0,7366$ , respectivamente). Na comparação entre a PCR2 e IL-6 1 e TNF1, não houve diferença estatística entre os valores de sensibilidade ( $p = 0,1118$  para IL-6 1 e  $p = 0,0628$  para o TNF1) e para especificidade ( $p = 0,9557$  para IL-6 1 e  $p = 0,5947$  para TNF1), embora com a acurácia superior à do TNF- $\alpha$  ( $p = 0,0349$ ).

A sensibilidade e especificidade do leucograma foram semelhantes ao da IL-6 1 ( $p = 0,1924$  e  $p = 0,3033$ , respectivamente) e do TNF1 ( $p = 0,3485$  e  $p = 0,5783$ , respectivamente), porém, com acurácia inferior em relação à primeira medida da IL-6 ( $p = 0,0459$ ).

A IL-6 apresentou índices semelhantes àqueles do TNF- $\alpha$  no tocante à sensibilidade ( $p = 0,7460$ ), especificidade ( $p = 0,6369$ ) e acurácia ( $p = 0,3067$ ) no primeiro momento. Entre

a primeira e a segunda medida e entre a primeira e a terceira medida da IL-6 não houve diferença significativa na sensibilidade ( $p = 0,1924$ ), especificidade, ( $p = 0,7289$  e  $0,3033$ ) e acurácia ( $p = 0,9044$  e  $0,950$ ). O TNF- $\alpha$  também apresentou o mesmo padrão, sem diferença estatística na sensibilidade ( $p = 0,273$ ), especificidade ( $p = 0,1775$ ) e acurácia ( $p = 0,6486$ ) entre o TNF1 e TNF2.

De um modo geral, a associação dos exames não se mostrou superior às dosagens isoladas de cada marcador em si. No entanto, a associação do leucograma e da PCR2 apresentou uma sensibilidade superior àquela do leucograma isoladamente ( $p = 0,0018$ ), e a obtenção de dosagem seriada da PCR apresentou aumento significativo da sensibilidade quando comparada com dosagem apenas inicial ( $p = 0,0321$ ). Os valores dos índices diagnósticos encontram-se expostos na Tabela 4.

## Discussão

A amostra estudada representou a população normalmente atendida em centros de terapia intensiva neonatal, com



predomínio de RN pré-termo de muito baixo peso e com predomínio de cocos gram-positivos como agentes da sepse neonatal tardia. Estafilococos coagulase-negativos têm sido os agentes mais comuns isolados nas hemoculturas na sepse neonatal tardia<sup>12,16</sup>, embora sejam os agentes contaminantes mais comuns. O crescimento do agente em duas amostras de hemocultura, com mesmo perfil antimicrobiano, ajudou na caracterização como os agentes responsáveis pelo quadro séptico.

O trabalho demonstrou que o leucograma possui uma acurácia diagnóstica comparável àquela apresentada pelo IL-6 e TNF- $\alpha$ , embora inferior à dosagem seriada da PCR. Na literatura, os valores de sensibilidade e especificidade encontrados variam amplamente, uma vez que há heterogeneidade importante nas definições de contagem neutrofílica total e subdivisões; e os índices de sensibilidade variam entre 17 e 100% e a especificidade, entre 31 e 100%<sup>7,17-19</sup>. O valor preditivo negativo elevado do leucograma tem sido valorizado, possibilitando ao clínico maior segurança em afastar um quadro suspeito de sepse neonatal tardia<sup>7,19</sup>.

A PCR se mostrou um bom marcador diagnóstico, superior ao leucograma e comparável ao desempenho das duas citocinas, mesmo na sua primeira aferição, embora habitualmente ela seja considerada um marcador tardio, pois há necessidade de um intervalo de tempo entre o estímulo infeccioso, sua produção e elevação dos níveis séricos. Por outro lado, seu valor preditivo negativo elevado também se mostra clinicamente importante, pois a dosagem sérica seriada continuamente normal pode indicar, com segurança razoável, que a criança não esteja infectada. Em amostras seriadas, durante episódios de sepse tardia, Benitz et al.<sup>20</sup> encontraram ascensão da sensibilidade 61,5 para 84,4% e da especificidade, de 68,9% para 74,6%, entre a amostra inicial e 24 horas depois.

Em estudos de sepse neonatal tardia, os índices diagnósticos variam amplamente também, com sensibilidade oscilando entre 39 e 97,5% e a especificidade entre 47 e 100%. Tais oscilações se explicam pelas diferenças nas coletas (única ou seriada), pelo método de dosagem, pela determinação variável dos limites de corte e pela própria definição de sepse (nem sempre comprovada por cultura)<sup>19-23</sup>.

A acurácia diagnóstica da IL-6 se mostrou também boa, e, embora possa ter sido observado queda importante na mediana do marcador ao longo do tempo, a sensibilidade, especificidade e acurácia não se alteraram significativamente. Procianny & Silveira<sup>24</sup> também relataram que o tempo de coleta é importante para a detecção de altos níveis da citocina no plasma. Ocorre retorno dos níveis séricos à normalidade em menos de 48 horas, na maioria dos casos de sepse<sup>25-27</sup>. A principal utilidade diagnóstica da citocina é a de ser um marcador precoce; medidas posteriores poderiam ser dispensadas, pois poderiam gerar erros de interpretação<sup>15,28</sup>.

O TNF- $\alpha$  mostrou um desempenho semelhante ao da IL-6 no diagnóstico da sepse tardia nos três momentos de coleta.

Roman et al.<sup>29</sup> encontraram valores mais elevados de sensibilidade e especificidade (91,3 e 100%, respectivamente). No entanto, tal diferença pode ser justificada por um número menor de crianças estudadas e com um a proporção significativa de crianças com evolução para choque e/ou óbito. Ng et al. (1997)<sup>30</sup>, em estudo de sepse tardia em 68 RN de muito baixo peso ao nascer, demonstraram valores elevados de sensibilidade (82%), especificidade (86%), valor preditivo positivo (82%) e valor preditivo negativo (85%), mantendo-se um índice elevado só depois de 24-48 horas da primeira amostragem.

Na análise da associação dos testes, a combinação do desempenho do leucograma com a PCR mostrou-se significativamente melhor que seu uso isolado, e a dosagem seriada da PCR também melhorou sua taxa de sensibilidade, contando ainda com valor preditivo negativo bastante elevado. Dessa forma, como ambos são testes rotineiros nas unidades de terapia intensiva neonatais, a interpretação e o uso e correto desses testes são de grande valia.

A dosagem da citocinas citadas no momento da suspeita clínica associada a esses dois exames rotineiros não se mostrou superior às dosagens isoladas, embora diversos autores tenham evidenciado melhora no poder diagnóstico na associação de PCR com a IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>15,30</sup>.

O grupo de sepse provável mostrou alterações no leucograma e nos níveis de PCR e das duas citocinas muito semelhantes ao apresentado pelo grupo de sepse comprovada por cultura. Isso mostra que tais casos, muito provavelmente, eram realmente de sepse, apesar das culturas negativas. Alguns trabalhos também mostraram fatos semelhantes e, por vezes, incluíam essas crianças no grupo daquelas com sepse comprovada<sup>7,21,26</sup>.

Como conclusão, foi possível demonstrar que o uso do leucograma e da PCR se mostrou comparável à dosagem da IL-6 e TNF- $\alpha$ , permitindo um diagnóstico mais precoce da sepse neonatal tardia. Considerando que tais testes têm a vantagem de serem mais disponíveis, com técnicas de execução mais padronizadas e de custo mais acessível, poderão auxiliar na difícil decisão médica de iniciar ou não o tratamento antimicrobiano frente a um RN com suspeita de sepse.

## Referências

1. Klein J, Marcy MS. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus & newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005. p. 835-90.
2. Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papile LA, Stoll BJ, et al. [Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996](#). Pediatrics. 2001;107:E1.
3. Mussi-Pinhata MM, Rego MA. [Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar](#). J Pediatr (Rio J). 2005;81:S59-S68.

4. Calil R, Marba ST, von Nowakonski A, Tresoldi AT. [Reduction in colonization and nosocomial infection by multiresistant bacteria in a neonatal unit after institution of educational measures and restriction in the use of cephalosporins](#). *Am J Infect Control*. 2001;29:133-8.
5. Baltimore RS. [Neonatal sepsis: epidemiology and management](#). *Paediatr Drugs*. 2003;5:723-40.
6. da Silva O, Ohlsson A, Kenyon C. [Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review](#). *Pediatr Infect Dis J*. 1995;14:362-6.
7. Jackson GL, Engle WD, Sendelbach DM, Vedro DA, Josey S, Vinson J, et al. [Are complete blood cell counts useful in the evaluation of asymptomatic neonates exposed to suspected chorioamnionitis?](#) *Pediatrics*. 2004;113:1173-80.
8. Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004;89:F229-F35.
9. Gerdes JS. [Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate](#). *Pediatr Clin North Am*. 2004;51:939-59.
10. Kaufman D, Fairchild KD. [Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very low-birth-weight infants](#). *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:638-80.
11. Stover BH, Shulman ST, Bratcher DF, Brady MT, Levine GL, Jarvis WR. Pediatric Prevention Network. [Nosocomial infection rates in US children's hospitals' neonatal and pediatric intensive care units](#). *Am J Infect Control*. 2001;29:152-7.
12. Stoll BJ, Hansen N. [Infections in VLBW infants: studies from the NICHD neonatal research network](#). *Semin Perinatol*. 2003;27:293-301.
13. Gaynes RP, Edwards JR, Jarvis WR, Culver DH, Tolson JS, Martone WJ. [Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System](#). *Pediatrics*. 1996;98:357-61.
14. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. [The neonatal blood count in health and disease I. Reference values for neutrophilic cells](#). *J Pediatr*. 1979;95:89-98.
15. Silveira RC, Procianny RS. [Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis](#). *Acta Paediatr*. 1999;88:647-50.
16. Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Verter J, Poland RL, Bauer CR, et al. [Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network](#). *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17:593-8.
17. Rodwell RL, Taylor KM, Tudehope DI, Gray PH. [Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns](#). *Pediatr Infect Dis J*. 1993;12:372-6.
18. Guillois B, Donnou MD, Sizun J, Bendaoud B, Youinou P. [Comparative study of four tests of bacterial infection in the neonate. Total neutrophil count, CRP, fibrinogen and C3d](#). *Biol Neonate*. 1994;66:175-81.
19. Berger C, Uehlinger J, Ghelfi D, Blau N, Fanconi S. [Comparison of C-reactive protein and white blood cell count with differential in neonates at risk for septicemia](#). *Eur J Pediatr*. 1995;154:138-44.
20. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P. [Serial serum C-reactive levels in the diagnosis of neonatal infection](#). *Pediatrics*. 1998;102:E41.
21. Ehl S, Gering B, Bartmann P, Högel J, Pohlandt F. [C-reactive protein is a useful marker for guiding duration of antibiotic therapy in suspected neonatal bacterial infection](#). *Pediatrics*. 1997;99:216-21.
22. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, Pacifico L. [C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection](#). *Clin Chem*. 2003;49:60-8.
23. Franz AR, Bauer K, Schalk A, Garland SM, Bowman ED, Rex K, et al.; International IL-8 Study Group. [Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: a multicenter, randomized, controlled trial](#). *Pediatrics*. 2004;114:1-8.
24. Procianny RS, Silveira RC. [A influência do tempo de coleta sobre os níveis de interleucina-6 na sepse neonatal precoce](#). *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:407-10.
25. Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartmann P, Pohlandt F. [Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection](#). *Pediatrics*. 1994;93:54-8.
26. de Bont ES, Martens A, van Raan J, Samson G, Fetter WP, Okken A, et al. [Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis](#). *Pediatr Res*. 1993;33:380-3.
27. Ng PC, Li K, Wong RP, Chui K, Wong E, Li G, et al. [Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections](#). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88:F209-13.
28. Panero A, Pacifico L, Rossi N, Mancuso G, Stegagno M, Chiesa C. [Interleukin 6 in neonates with early and late onset infection](#). *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:370-5.
29. Roman J, Fernandez F, Velasco F, Rojas R, Roldan MR, Torres A. [Serum TNF levels in neonatal sepsis and septic shock](#). *Acta Paediatr*. 1993;82:352-4.
30. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W, et al. [Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants](#). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1997;77: F221-7.

## Correspondência:

Sérgio Tadeu Martins Marba  
 Rua Paulo Setúbal, 335/64  
 CEP 13020-240 - Campinas, SP  
 Tel.: (19) 3521.9307, (19) 9187.7727  
 Fax: (19) 3521.9307  
 E-mail: sergio@caism.unicamp.br